

Determinación completamente automatizada de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y sus metabolitos en muestras de suero

Palabras claves: THC, THC-OH, THC-COOH, suero, extracción en fase sólida SPE, automatización, GC/MS

Resumen

En esta nota presentamos un sistema analítico completamente automatizado para determinar el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y sus metabolitos en suero de sangre. La automatización se basa en el MultiPurpose Sampler (MPS) de Gerstel, equipado para la extracción en fase sólida (GERSTEL SPE) y un módulo para la evaporación automatizada del eluato (GERSTEL MultiPosition Evaporation Station, mVAP).

El método validado y semi-automatizado es utilizado para el análisis de rutina, y ha sido transformado y automatizado utilizando el sistema descrito. Se han implementado mejoras tales como la reducción de la muestra utilizada de 1 a 0,5 mL de suero y el uso de cartuchos SPE de formatos menores de 1 mL.

El método analítico ha sido validado de acuerdo con las directrices de la GTFCh (Sociedad de Química Toxicológica y Forense de Alemania). Se han obtenido límites de cuantificación por debajo de 1 ng/mL de THC y THC-OH, eficiencias de extracción entre 70 y 93 %, y unas desviaciones estándar relativas entre 3,3 y 10 %. El sistema SPE realiza la preparación de las muestras paralelamente al análisis cromatográfico, y con lo cual le permite al sistema GC/MS de operar en su productividad máxima y capacidad completa.



Figura 1: Configuración del instrumento para la determinación automática de THC y sus metabolitos en suero de sangre. El automuestreador MultiPurpose Sampler (MPS) con cabezal doble y equipado con agitador, estación de lavado-enjuague estándar, gradillas para los viales del eluato, cartuchos de SPE y muestras, módulo SPE, dos estaciones de rellenado de solventes (SFS), estación de evaporación de múltiples posiciones (mVAP) y estación de frascos de solventes (de izquierda a derecha). El cabezal izquierdo tiene instalado una jeringa de 10 μ L para la inyección, cabezal derecho una jeringa de 2,5 mL para los pasos de preparación de las muestras. Sistema GC/MS: Agilent GC 7890 / MSD 5977 (Agilent Technologies).

Introducción

El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) es el compuesto psicoactivo más importante de las hojas del cannabis. Después de su consumo es metabolizado en el cuerpo al metabolito activo 11-hidroxid- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC-OH) y posteriormente al metabolito inactivo 11-nor-9-carboxid- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC-COOH). Ya que la consumo de cannabis tiene una influencia negativa a las capacidades de una persona de conducir un automóvil [1], conducir bajo la influencia de THC está prohibido en Alemania y en muchos otros países. Si se determina en el suero una concentración mayor al 1 ng/mL, se puede imponer una prohibición de conducción de un automóvil. En esta situación el perfil de la consumo puede jugar un papel importante. A partir de las concentraciones de los metabolitos se puede estimar un perfil, ya que un alto nivel de THC-OH revela una consumo reciente de cannabis, y un alto nivel de THC-COOH indica una consumo frecuente de cannabis.

Por esta razón, la determinación de THC y sus metabolitos en suero de sangre es una tarea realizada rutinariamente en laboratorios forenses. La extracción en fase sólida (SPE) se utiliza habitualmente para la extracción de los analitos y para una purificación adecuada. Muchos laboratorios realizan un análisis por GC/MS(/MS), el cual requiere de un paso de derivatización para transformar los compuestos (especialmente el THC-COOH) en compuestos compatibles al GC [2-6]. La preparación de las muestras normalmente incluye varios pasos manuales. Esto implica una alta carga de trabajo para el personal del laboratorio, incluyendo su exposición a solventes y reactivos potencialmente tóxicos, y esto significa que ocurran errores con mayor probabilidad. Por eso es preferible una automatización completa del análisis.

Parte Experimental

Instrumentación: Las muestras se prepararon en el automuestreador MultiPurpose Sampler (MPS) en la versión con cabezal doble, equipado con el módulo para la extracción en fase sólida (SPE) y con un sistema de evaporación MultiPosition Evaporation Station mVAP (todos éstos de GERSTEL). El automuestreador se ha montado sobre un sistema de GC/MS, vea la figura 1.

El cabezal derecho del automuestreador ha sido equipado con una jeringa de 2,5 mL, la cual se utiliza para los pasos de preparación de las muestras (excepto la adición del MSTFA = N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida, para la derivatización). El izquierdo ha sido equipado con una jeringa de 10 μ L para la inyección al GC. Todos los solventes y muestras han sido dosificados con la jeringa de 2,5 mL garantizando un flujo controlado y reproducible al cartucho SPE. El cartucho SPE estándar ha sido cortado en la parte superior y acoplado a un adaptador de transporte, y



Figura 2: Arriba: Cartuchos SPE configurados para el SPE GERSTEL automatizado. Abajo: Cartuchos estándar SPE.

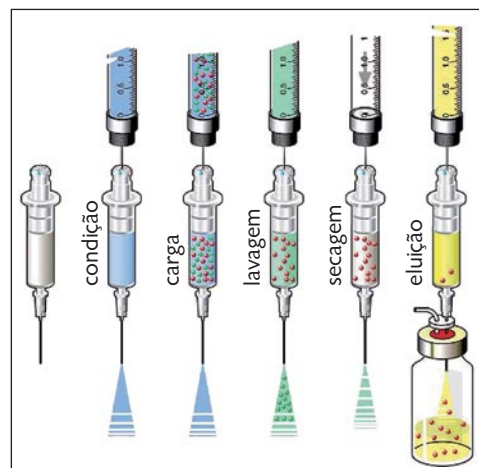


Figura 3: Flujo de trabajo automatizado de SPE con el módulo GERSTEL SPE.

se los utilizaron con jeringas estándar para la extracción, vea la figura 2. Los cartuchos apropiados se pueden adquirir comercialmente de Macherey&Nagel, Agilent, Sigma-Aldrich, Phenomenex, Bekolul, etc. Trabajos previos han demostrado que se pueden transferir los procedimientos manuales al automático utilizando cartuchos SPE con dimensiones del lecho estándar. El proceso completo se controla convenientemente con el software GERSTEL MAESTRO [7, 8]. El flujo de trabajo automatizado se muestra gráficamente en la figura 3. Los cartuchos SPE se secan mediante una línea de suministro de gas conectada a la jeringa. Los viales y cartuchos sellados minimizan el riesgo de contaminación de la muestra y pérdida de solventes. El módulo mVAP facilita la evaporación de los eluatos bajo condiciones controladas de vacío, temperatura y agitación.

El MPS ha sido montado en un GC 6890, acoplado a un 5973 MSD, para el análisis por GC/MS. Las muestras se han introducidas a la columna analítica mediante un inyector de altas temperaturas con/sin división, VF-1ms 25 m, di = 0,2 mm, df = 0,33 μ m (todos de Agilent Technologies).

Materiales, solventes y reactivos: Las muestras fueron extraídas mediante cartuchos de extracción en fase sólida de 1 mL C18ec 100 mg (M&N,

730011MPS, Alemania). Estos cartuchos estándar de SPE pueden adquirirse directamente con el adaptador de transporte y la jeringa para facilitar la automatización de la SPE.

Todos los solventes y sales eran del grado analítico. MSTFA ha sido adquirido de Macherey&Nagel. Una solución de silicona en isopropanol (Serva Electrophoresis, Alemania) ha sido utilizada para enjuagar los viales para el eluato y la calibración, los cuales se secaron a temperatura de ambiente o en un horno antes de ser utilizados en el análisis.

Preparación de los patrones y soluciones: Los patrones de THC, THC-OH y THC-COOH, cada uno de 1 mg/mL en metanol, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. De las soluciones madres se han preparado tres soluciones de trabajo de 500, 50 y 5 ng/mL del analito en metanol (Nota: ¡THC-COOH ha sido presente en todas las soluciones en una concentración 10 veces más alta!) Estas soluciones de trabajo fueron usadas para la calibración y para fortificar las muestras de control.

Los patrones de 0,1 mg/mL de THC-D3 y THC-OH-D3 y de 1 mg/mL de THC-COOH-D3 fue-

ron adquiridos de Sigma-Aldrich. Mediante una dilución intermedia de 1:100 se ha preparado una solución de trabajo interno de 60 ng/mL de THC-D3 y THC-OH-D3 y 600 ng/mL de THC-COOH-D3 respectivamente. Se ha añadido un volumen de 50 µL de esta solución a cada muestra y a cada muestra calibración y de control.

Condiciones Analíticas

MPS:	Volumen de inyección 3 µL
Temperatura de inyección:	280°C
Liner de entrada:	Desactivado, taper simple (Agilent)
Modo de inyección:	sin división, 2 min
Neumática:	134,5 kPa He, presión constante
Horno:	160 °C (1 min); 10 °C/min; 180 °C (8 min); 5 °C/min; 220 °C (4 min); 15 °C/min; 270 °C (5 min); 10 °C/min; 300 °C (5 min)
Post-análisis:	325 °C (2 min), 350 kPa
Columna:	VF-1ms (Agilent) 25 m, d _i = 0,2 mm, d _r = 0,33 µm
Línea de transferencia:	300 °C
Modo MSD:	Monitoreo de iones seleccionados (SIM)
Temperatura de la fuente:	230°C
Masas SIM:	
m/z (THC):	386, 371, 303
m/z (THC-D3):	389, 374, 306
m/z (THC-OH):	371, 474, 459
m/z (THC-OH-D3):	374, 477, 462
m/z (THC-COOH):	371, 473, 488
m/z (THC-COOH-D3):	374, 476, 491

Preparación de las muestras

Pasos manuales de preparación de las muestras: Diluir 500 µL de una muestra de suero con 500 µL de 10 % de ácido acético y 50 µL de la solución de trabajo del patrón interno.

Centrifugar la mezcla, si se observa un precipitado, transferir el sobrenadante a un vial limpio y depositarlo en la gradilla del automuestreador. Estos pasos se podrían automatizar ya que existen centrifugas aptas para el MPS.

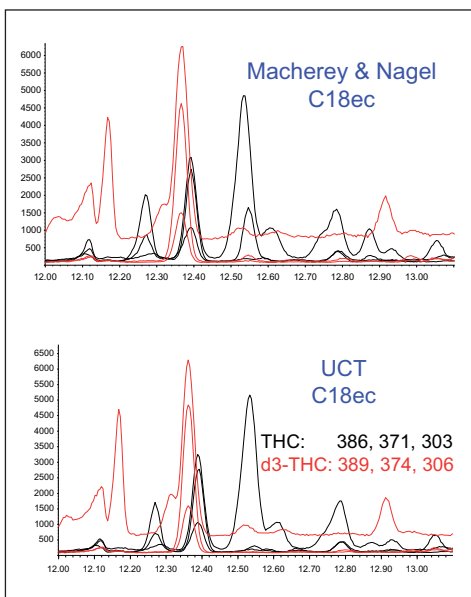


Figura 4: Comparación de los cromatogramas utilizando los sorbentes de UCT (izquierda) y Macherey&Nagel C18ec para la extracción de THC (mostrada aquí), THC-OH y THC-COOH. Los materiales del sorbente son equivalentes.

Tabla 1: Comparación de los resultados analíticos utilizando el cartucho UCT (izquierda) y el cartucho C18ec de Macherey&Nagel para la extracción de THC (mostrada aquí), THC-OH y THC-COOH. Los materiales del sorbente son iguales.

Producto analizado	THC [ng/mL]	THC-OH [ng/mL]	THC-COOH [ng/mL]	Producto analizado	THC [ng/mL]	THC-OH [ng/mL]	THC-COOH [ng/mL]
Muestra 1	1,7	1,8	17,5	Muestra 1	1,8	1,6	18,2
Muestra 2	1,7	1,6	18,9	Muestra 2	1,8	1,7	19
Muestra 3	1,9	2	20,5	Muestra 3	1,7	1,7	19,5
Muestra 4	1,8	1,7	19,4	Muestra 4	1,8	1,9	20,5
Muestra 5	1,8	1,7	17,5	Muestra 5	1,7	1,7	18,6
Media	1,8	1,8	18,8	Media	1,8	1,7	19,2
RSD [%]	4,4	8,6	6,8	RSD [%]	3,3	6,5	4,7



¡Encaje perfecto!



La solución óptima

Para su preparación de muestras, automatizada e individual adaptada a sus exigencias. Las soluciones modulares y singulares de GERSTEL incrementan su eficiencia y potencial de sus análisis GC/MS y LC/MS, seguro y sustentable.

- ✓ Series de dilución y de patrones
- ✓ SPE y SPE en línea (SPEXOS)
- ✓ Headspace dinámico (DHS), HS & SPME
- ✓ Twister & Termodesorción / -extracción
- ✓ Alta productividad gracias a la función PrepAhead
- ✓ Asistencia competente: sólo una llamada

GERSTEL – Analítica perfecta



Pregúntenos cómo puede ayudarle la tecnología GERSTEL

GERSTEL

www.gerstel.es

Pasos automatizados de la preparación de las muestras:

- Condicionar el cartucho SPE con 2 mL cada uno de metanol, de agua desionizada y de 0,1 M ácido acético.
- Cargar la muestra entera al cartucho SPE.
- Lavar el cartucho SPE con 2 mL cada uno de 0,1 M ácido acético y de una mezcla de agua con acetonitrilo (40/60 v/v).
- Secar el cartucho SPE purgándolo con un flujo de nitrógeno durante 1 min.
- Eluir los analitos con 2 x 200 µL acetonitrilo.
- Evaporar el eluato al seco a 60 °C, 100 mbar y agitándolo con 250 rpm durante 5 min en el módulo mVAP.
- Reconstituir en 25 µL MSTFA agitándolo (agitador a 750 rpm) durante 5 min a temperatura de ambiente.
- Inyectar 3 µL de la solución al inyector caliente resultando en una siliación simultánea de los analitos y transferencia a la columna GC.

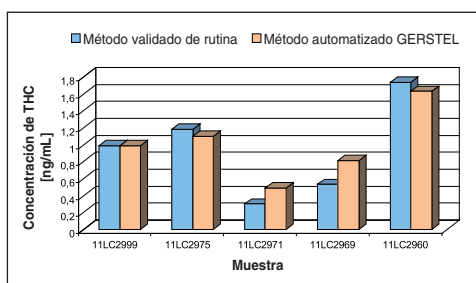


Figura 5: Comparación de los resultados analíticos obtenidos utilizando el método validado de rutina y el método automatizado GERSTEL para la cuantificación de THC cerca del límite de cuantificación.

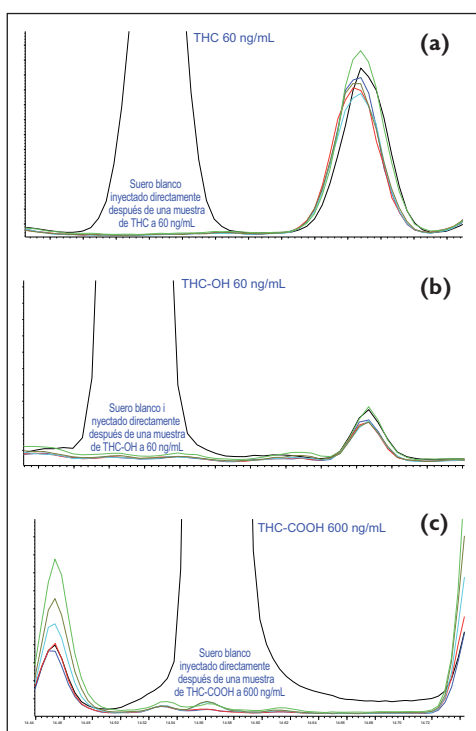


Figura 6: El método de análisis completamente automatizado no muestra un arrastre para (a) THC, (b) THC-OH y (c) THC-COOH.

Resultados y discusión

El método original y validado utiliza cartuchos 3 mL C18ec 200 mg SPE de UCT (EE UU) y un volumen de las muestras de 1 mL. Ya que estos cartuchos no están disponibles en el formato necesario para GERSTEL, se han probado los cartuchos de Macherey&Nagel con nominalmente el mismo material y peso del sorbente. Los trazados del analito y del fondo han sido equivalentes para todos los compuestos en ambos cartuchos, en la figura 4 se muestra el rendimiento del cartucho con THC. También los resultados analíticos han sido esencialmente equivalentes, vea la tabla 1. Debido a eso, se han utilizado los cartuchos Macherey&Nagel para todas las mediciones subsecuentes.

Es importante aclarar la comparabilidad de los valores analíticos resultantes del método completamente automatizado y del método de rutina y validado.

Para comprobar esto, se analizaron por ambos métodos unas muestras de suero fortificadas y con concentraciones bajas. En la figura 5 se puede observar que los resultados obtenidos por ambos métodos, en concentraciones de THC muy cerca del límite de cuantificación, concuerdan excelentemente. Los resultados analíticos para los dos metabolitos también muestran una buena concordancia.

Un aspecto importante para la validación de un sistema de análisis automatizado es de comprobar el arrastre de una muestra a otra. El rendimiento del sistema con respecto al arrastre ha sido estudiado al analizar seis muestras de suero fortificadas con altas concentraciones de los analitos (60 ng/mL THC, y THC-OH, y 600 ng/mL THC-COOH). Después de cada muestra se ha analizado una muestra de suero blanco. No se ha detectado un arrastre significativo en los cromatogramas de las muestras blancas, como se puede observar en las figuras 6 a – c.

Después de haber comprobado exitosamente estos temas, se ha buscado de optimizar aún más el método automatizado. Se ha reducido la escala del método, utilizando un cartucho de 1 mL 100 mg C18ec en vez del cartucho con 3 mL

200 mg C18ec, y al reducir todos los volúmenes de los solventes por el mismo factor. El volumen de las muestras de suero ha sido reducido de 1 mL a 0,5 mL. Después de la extracción y purificación, las muestras han sido reconstituidas en 25 µL MSTFA en vez de 40 µL. Como se puede observar en la figura 7, los resultados obtenidos mediante los dos métodos están en muy buena conformidad. Las alturas de los picos de los analitos han sido similares, y los niveles del fondo aparentemente se notaban levemente disminuidos al utilizar volúmenes más pequeños.

El método final ha sido validado, vea la tabla 2. Los criterios de validación han sido cumplidos, y algunos de los valores se muestran en la tabla 2. Se obtuvieron límites de cuantificación por debajo de 1 ng/mL para THC y THC-OH. Se han obtenido eficiencias de extracción entre 70 y 93 % y repetibilidades entre 3,3 y 10 % (repetibilidades entre-días de 6,7 a 16,3 % respectivamente). Las calibraciones se realizaron utilizando patrones sobre la base de solventes, lo cual ha sido posible utilizando patrones internos deuterados para cada analito. Además ha sido comprobado de antemano, que las líneas de calibración del suero fortificado y de los patrones de solventes son equivalentes. Las líneas de calibración y los resultados analíticos han sido calculados sobre la base de las alturas de los picos. Como fue mencionado, esto ha sido posible debido al uso de un patrón interno. Al utilizar las alturas de los picos para el cálculo ya no influyen negativamente en los resultados analíticos los hombros en los laterales causados por la co-elución y la ausencia de una separación en la línea base – situación muy probable al utilizar una detección con un simple MS cuadrupolar para matrices complejas.

El software GERSTEL MAESTRO integrado en el ChemStation o MassHunter de Agilent controla el proceso completo de la preparación de muestras. El solapamiento de la preparación automatizada de las muestras con el análisis cromatográfico permite al sistema GC/MS de operar en plena capacidad ya que durante el análisis por GC/MS de una muestra se prepara la próxima muestra a la cual se puede inyectar inmediatamente al finalizar el análisis de la anterior.

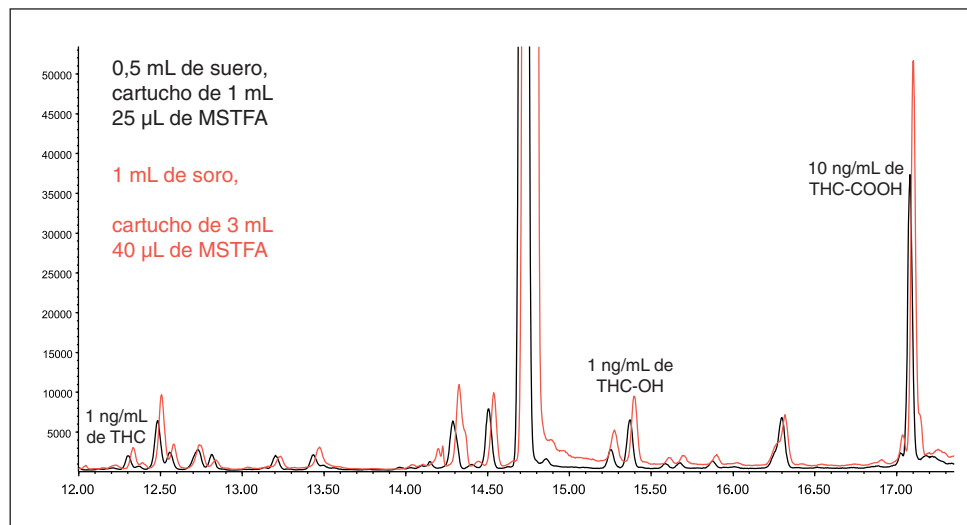


Figura 7: El método completamente automatizado y optimizado (cromatograma en negro) produce similares áreas de picos a las del método de análisis original de rutina pero con un fondo levemente menor.

Tabla 2: Data validada para el método de análisis completamente automatizado según las directrices de la GTFCh [9].

Producto analizado	Limite de detección [ng/mL]	Limite de cuantificación [ng/mL]	Repetibilidad [%]			Repetibilidad entre-días [%]			Eficiencia de extracción [%]		
			1.2 ng/mL	5.5 ng/mL	25 ng/mL	1.2 ng/mL	5.5 ng/mL	25 ng/mL	1.2 ng/mL	5.5 ng/mL	25 ng/mL
THC	0,3	0,7	5,2	7,2	3,8	7,8	7,2	6,7	75	74	70
THC-OH	0,3	0,9	3,5	10	3,5	16,3	10	6,9	93	82	86
THC-COOH	<1	5	3,7	6,6	3,3	8,6	7,1	7,1	83	79	87

Conclusiones

Un método de análisis, validado y semi-automatizado de rutina, de THC y sus metabolitos en suero ha sido transferido exitosamente a un sistema de análisis completamente automatizado.

Los resultados analíticos del método completamente automatizado son precisos, exactos y comparables a los resultados del método semi-automatizado y de rutina.

Los datos de validación en la tabla 2 fueron obtenidos según las directrices de la GTFCh, y los criterios de la validación fueron cumplidos.

El sistema es altamente flexible y abre la posibilidad de automatizar otros flujos de trabajos establecidos de preparación de muestras en diferentes campos de aplicación.

Referencias

- [1] R.A. Sewell, J. Poling, M. Sofuoglu: „The Effect of Cannabis Compared with Alcohol on Driving”, *American Journal of Addiction* 18 (2009) 185
- [2] R.H. Lowe, E.L. Karschner, E.W. Schwilke, A.J. Barnes, M.A. Huestis: „Simultaneous quantification of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-delta-9 tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), and 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) in human plasma using twodimensional gas chromatography, cryofocusing, and electron impact-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A* 1163 (2007) 318
- [3] E.L. Karschner, E.W. Schwilke, R.H. Lowe, W.D. Darwin, H.G. Pope Jr, R. Herning, J.L. Cadet, M.A. Huestis: „Do Δ 9-Tetrahydrocannabinol Concentrations Indicate Recent Use in Chronic Cannabis Users?”, *Addiction* 104 (2009) 2041
- [4] J. Röhrich, I. Schimmel, S. Zörnlein, J. Becker, S. Drobnik, T. Kaufmann, V. Kuntz, R. Urban: „Concentrations of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9 Carboxyte-tetrahydrocannabinol in Blood and Urine after Passive Exposure to Cannabis Smoke in a Coffee Shop”, *Journal of Analytical Toxicology* 34 (2010) 196
- [5] N. Roth, S. Kneisel, V. Auwärter: „Stabilität von Cannabinoiden in Serumproben nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen und Lagerung in Glas bzw. Kunststoffröhrchen”, *Toxichem Krimtech* 78 (2011) 36
- [6] A. Rickert, T. Gorn, T. Daldrup: „Stabilität von Δ 9-THC, 11-OH-THC und THC-COOH in tiefgekühlten, forensischen Serumproben”, *Toxichem Krimtech* 78 (2011) 373
- [7] F.D. Foster, J.R. Stuff, J.A. Whitecavage, E.A. Pfannkoch: „Automation of Solid Phase Extraction Methods using a Robotic X-Y-Z Coordinate Autosampler with Software Control”, *GERSTEL AppNote* 03/2009
- [8] F.D. Foster, J.R. Stuff, E.A. Pfannkoch: „Automated Solid Phase Extraction (SPE)-LC-MS/MS Method for the Determination of Acrylamide in Brewed Coffee Samples”, *GERSTEL AppNote* 13/2012
- [9] F.T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, F. Mußhoff, L.D. Paul, B. Aebi, V. Auwärter, T. Kraemer, G. Skopp: „Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden”, *Toxichem Krimtech* 76 (2009) 185

GERSTEL, Alemania

Anote el 314-321

Oliver Lerch, Susanne Rose
Gerstel GmbH & Co. KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, D-45473 Mülheim an der Ruhr, Alemania

Lars Radünz, Hans-Werner Schütz, Jasna Neumann, Gertrud Rochholz

Centro Médico Universitario de Schleswig Holstein, Departamento de Medicina Forense, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel, Alemania